

金钱鱼抗缪勒氏管激素基因克隆及其在性腺发育 不同时期 mRNA 表达水平的分析

曾文刚, 刘振浩, 李红, 张俊彬*

(上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 为了解抗缪勒氏管激素基因(*AMH*)在金钱鱼性腺发育中的作用,本研究利用 RACE 技术克隆了 *AMH* 的 cDNA 序列全长,为 2 324 bp(GenBank 登录号:KP718479),其开放阅读框为 1 631 bp,编码 543 个氨基酸。同源性分析显示金钱鱼 *AMH* 与花鲈相似性最高,为 71.16%,与斑马鱼相似性仅为 29.83%。系统进化树分析表明,该基因与鲈形目紧密聚为一支,与金钱鱼进化地位一致,说明 *AMH* 在进化中有一定保守性。氨基酸结构分析表明其 1~28 为信号肽序列,69~426 为 *AMH*-N 区域,444~543 为 TGF- β 结构区。实时荧光定量研究表明,金钱鱼成鱼中 *AMH* 基因在精巢中表达量显著高于其他组织,在肝和卵巢中也有表达。性腺不同发育时期分析表明,*AMH* 基因在精巢发育 I、II 和 III 期均维持高水平表达,IV 期表达水平有所降低,H.E 染色结果显示这一时期精巢发育逐渐成熟,推测该基因在精巢发育和精子产生过程中有重要作用。在卵巢中,*AMH* 在 I、II 期卵巢发育初期表达量较低,在 III、IV 期卵母细胞大生长期及卵黄积累期表达量升高,推测其在卵母细胞的发育和功能维持上发挥作用。提示 *AMH* 基因在金钱鱼精巢、卵巢发育过程中均发挥重要作用。

关键词: 金钱鱼; *AMH* 基因; 序列分析; 基因表达

中图分类号: Q 785; S 965.3

文献标志码: A

抗缪勒氏管激素(anti-Müllerian hormone, *AMH*)也称为缪勒氏管抑制物质(Müllerian inhibiting substance, *MIS*),是由 2 个 72 ku 的单体通过二硫键连接构成的二聚体糖蛋白,属于 β 转化生长因子(transforming growth factor- β , TGF- β)超家族成员,广泛存在于脊椎动物和无脊椎动物的性腺中^[1-2]。1947 年法国科学家 Alfred Jost 在 小鼠(*Mus musculus*) 睾丸中首先发现。*AMH* 基因在哺乳动物雄性性腺分化期抑制缪勒氏管形成,阻止雌性生殖管发育,使中肾管发育成附睾、输精管和精囊^[1]。但是在卵巢发育早期中并不合成 *AMH*,因此缪勒氏管不受抑制,则发育成输卵管、子宫、阴道上缘等雌性生殖系统^[3-4],*AMH* 是性别分化的一个重要因子。通过对人(*Homo sapiens*)和小鼠 *AMH* 基因启动子研究发现,5'端序列存在 GATA、WT-1、SF-1、DAX-1

和 Sox9 等转录调控因子结合位点^[5]。哺乳动物胚胎时期,Sox9 先于 *AMH* 表达,在性别分化期形成 Sox9-Amh-Cyp19a1 信号级联,通过调节激素来调控性别的分化^[6]。睾丸发育过程中,*AMH* 能够抑制睾丸间质细胞增殖和类固醇合成酶表达,通过调节睾酮的分泌来调控睾丸的发育^[7]。卵巢发育过程中,*AMH* 通过抑制颗粒细胞增殖和芳香化酶活性与 FSH 相互作用调控卵泡细胞的发育^[8-9]。*AMH* 水平间接反映卵巢储备功能,在生殖医学中,*AMH* 水平通常作为女性卵巢存储量的指标^[10-11]。虽然在大部分硬骨鱼中缪勒氏管已经退化,但研究发现其在硬骨鱼类精巢发育中依然有重要作用^[12]。现已从多种硬骨鱼中克隆到 *AMH* 基因,并对其表达模式做了初步研究。在日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)和牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)中,*AMH* 表达于未成熟

收稿日期:2015-04-14 修回日期:2015-06-09

资助项目:国家自然科学基金(41176109)

通信作者:张俊彬,E-mail:jb-zhang@shou.edu.cn

支持细胞,而在卵巢中并不表达^[13]。在斑马鱼 (*Danio rerio*) 中,最早可在未分化性腺中检测到 *AMH*, 随后则表现出两性表达模式^[14]。在硬骨鱼中 *AMH* 特殊的表达模式反映出其在硬骨鱼性腺发育中起重要作用。

金钱鱼 (*Scatophagus argus*), 隶属鲈形目 (Perciformes), 金钱鱼科 (Scatophagidae), 为广盐性杂食性鱼类, 为一种兼具观赏和食用价值的优质经济鱼类^[15]。但在人工繁育过程中会出现雌雄性腺发育不同期和雄性精子量少等问题, 严重阻碍了金钱鱼的大规模人工养殖。此外, 自然条件下金钱鱼为洄游性鱼类, 其性腺分化和发育影响因素较复杂, 具体机制还未阐明^[16-17]。因此通过对金钱鱼性别分化和发育相关基因的研究, 进一步探索其精巢分化发育的机制并建立金钱鱼亲鱼性成熟标准, 对改善金钱鱼人工繁育现状有重要意义和应用价值。

1 材料与方法

1.1 实验对象

实验金钱鱼采自广东珠海养殖基地。分别取成鱼 12 个组织: 脾, 心脏, 肝, 鳃, 肾, 肠, 脑, 肌肉, 鳍条, 垂体及雌雄性腺 (卵巢和精巢), 每个组织 5 条鱼的样品合为一管, 利用液氮迅速冷冻各个组织, 然后置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存待用。同时对采集的金钱鱼雌雄性腺组织进行分期鉴定, 根据观察金钱鱼卵巢发育可分为 I 卵原细胞增殖期, II 卵母细胞生长期, III 卵黄沉积期, IV 卵黄充满期。精巢发育可分为 I 精原细胞增殖期, II 精母细胞生长期, III 精母细胞成熟期, IV 精子细胞变态期^[16,18]。取不同时期的性腺组织用 Bouin 试剂进行固定, 然后进行石蜡切片和 H. E 染色, 显微镜观察。

1.2 总 RNA 提取和 cDNA 合成

各组织在液氮作用下研磨成粉末, 利用 Trizol (Invitrogen) 法提取 RNA。微量分光光度计 Nanodrop 2000 对总 RNA 进行定量测定, A260/A280 在 1.8~2.0 之间, 变性琼脂糖凝胶电泳证实结构完整的 RNA 用于反转录, 按照 PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa) 操作说明以 Oligod(T)16 Primer 为引物反转录, 获得 cDNA 用于克隆实验, 按照 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser

(TaKaRa) 操作说明进行反转录用于荧光定量, 反转录 cDNA 均稀释 10 倍。

1.3 *AMH* 基因全长 cDNA 序列克隆

根据金钱鱼转录组数据库序列设计引物 (表 1), 以精巢 cDNA 为模板, 扩增 *AMH* 中间片段, 反应体系 25 μL : 10 \times Buffer 2.5 μL 、 MgCl_2 μL 、dNTPs 1 μL 、模板 1 μL 、引物各 0.5 μL (10 μM)。反应条件: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 40 s, 35 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测回收, 与 pMD 18-T 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 挑取阳性克隆送上海迈普生物公司测序。

根据已获得的 *AMH* 中间片段分别设计 3' RACE 和 5' RACE 特异性引物 (表 1)。3' 端扩增以 oligo(dT) - AP 为反转录引物, 反应产物稀释 10 倍, 以 AP 和 3' RACE 特异引物 3AMH1 做第一轮 PCR 反应 (反应体系同中间片段扩增), 退火温度为 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。第一轮 PCR 产物稀释 10 倍, 取 1 μL 模板, 用引物 3' RACE - R 和特异性引物 3AMH2 作第二轮 PCR 反应, 退火温度为 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离回收、克隆、测序。5' 端扩增以特异性引物 5AMH1 为反转录引物, 用 RNaseH 消化 mRNA, 乙醇沉淀纯化 cDNA 后, 以 TdT 酶在 cDNA 3' 端加 poly(A) 尾, 得到 5' RACE 模板。以 oligo(dT) - AP 和 5AMH2 为引物, 进行一轮 PCR 反应, PCR 产物稀释 10 倍, 取 1 μL 为模板, 用 AP 和 5AMH3 为引物, 进行巢式 PCR 反应, PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离回收, 连接, 测序。

1.4 序列比较分析

使用 DNASTAR 对 5' RACE 和 3' RACE 测序所得序列进行拼接, 得到 *AMH* cDNA 全长。运用 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) 进行同源性分析。应用 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) 程序进行开放阅读框 (ORF) 分析并推导其相应氨基酸序列。利用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/smart/>) 对蛋白结构和功能进行分析。用 ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) 程序对得到的金钱鱼 *AMH* 氨基酸序列与其他物种进行多序列对比。应用 MEGA6.0 进行 1 000 次 bootstraps 值验证, 构建系统发育树。

表 1 本研究所用引物序列
Tab. 1 Sequence of primers

引物 primers	序列 sequence	位置(nt) position	引物作用 usage
AMH - F	AGAGGAGGAGGTGGGTACAGG		
AMH - R	CAATATGGGAGTTGAGCAGGAT	356	中间片段扩增
AMH - dF	AGAGGCTCGGGAGGCTCATAGA		
AMH - dR	ATTGACCAGAGGGACGGCACAG	290	Real time PCR
3AMH1	GAGTCAGTACCGTGCATTTCTTCT	1 049	3'RACE 第一轮
3AMH2	AACCATGCCATCCTGCTCAACTC	817	3'RACE 第二轮
5AMH1	TTGGTACGGTAGGACGAGTTGAG		5'反转录引物
5AMH2	CAGAAGAAATGCACGGTACTGACTC	1 025	5'RACE 第一轮
5AMH3	AGCTCTGGTAGCCCGCAGTCCCTC	959	5'RACE 第二轮
AMH - F2	ACAGGCACCCAAACAGACAGCG	41	
AMH - R2	ATGTTAGCAAAGACAAGACC	1 963	ORF 验证
Oligo(dT) ₁₆ AP	CTGATCTAGAGGTACCGGATCC(dT) ₁₆		5'RACE 上游引物 1
AP	CTGATCTAGAGGTACCGGATCC		5'RACE 上游引物 2
3'RACE - R	CTAGAGGTACCGGATCCTT		3'RACE 下游引物
β - actin - F	CTGTGCTGTCCCTGTATG		β - actin 内参引物
β - actin - R	TAGTCTGTGAGGTCACGG	151	β - actin 内参引物

1.5 金钱鱼 AMH 基因表达分析

根据得到的金钱鱼 cDNA 全长设计 AMH 定量引物,按照 SYBR Premix Ex Taq (Perfect Real Time, TaKaRa) 说明,使用 7500Real-time PCR 仪(Applied Biosystems, USA),进行实时定量 PCR 反应。15 μ L 反应体系:包括 SYBR Premix Ex Taq (2 \times) 7.5 μ L, ROX Reference Dye II 0.3 μ L,正反引物(10 μ mol/L)各 0.4 μ L,模板 cDNA 1.5 μ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C 30 s,95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 34 s,40 个循环。溶解曲线条件:95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 1 min,95 $^{\circ}$ C 15 s。每个样品重复 3 次,以金钱鱼 β - actin 为内参,应用 2^{- $\Delta\Delta$ C_T}法确定 AMH 基因 mRNA 表达量^[19],用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析,当 $P < 0.05$ 时差异显著。

2 结果与分析

2.1 金钱鱼 AMH 氨基酸序列的预测及与其他鱼类 AMH 氨基酸序列的比较

通过 RACE 法克隆获得金钱鱼 AMH 基因的 cDNA 序列,全长 2 324 bp,包括 5'非翻译区 66 bp,3'非翻译区 625 bp,开放阅读框为 1 631 bp,编码 543 个氨基酸。3'端含有多聚腺苷酸加尾信号(AATAAA)和 PolyA 尾。推测金钱鱼 AMH 氨基酸序列中 1~28 为信号肽序列,69~426 为 AMH-N 区域,444~543 为 TGF- β 结构区(图 1)。经分析预测其蛋白分子量为 58.744 ku,等电点为 5.44。

2.2 AMH 基因同源性分析

利用 CLUSTAL W2 在线软件对金钱鱼的 AMH 氨基酸序列和其他鱼类进行同源性比较,结果表明金钱鱼的 AMH 氨基酸序列与花鲈(*Lateolabrax japonicus*)和黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)相似性较高,分别为 71.35% 和 70.54%;而与斑马鱼和核雅罗鱼(*Squalius pyrenaicus*)相似性较低,仅为 29.83% 和 34.76%,这提示 AMH 基因在鱼类不同物种中保守性不高。但是在鱼类不同物种中 AMH 氨基酸序列均含有 AMH-N 域和 TGF- β 域,且在 TGF- β 域保守性相对较高。应用 MEGA6.0 软件构建系统进化树(图 2),结果显示,系统进化树可分为两大支:除矛尾鱼(*Latimeria chalumnae*)进化地位特殊外,哺乳类、两栖类和鸟类聚为一支,其他鱼类聚为一支,其中金钱鱼与鲈形目(Perciformes)亲缘性关系最近。

2.3 金钱鱼各组织中 AMH 基因 mRNA 表达的水平

利用 Real-time PCR 对金钱鱼肌肉、脾、脑、肾、肠、鳍条、鳃、心脏、垂体、肝、雌雄性腺(精巢和卵巢)共 12 个样品中 AMH 基因 mRNA 表达水平进行定量分析,结果显示在不同组织中 AMH 基因 mRNA 的表达水平差异大。在雄鱼精巢中 AMH 基因 mRNA 表达水平最高,明显高于其他组织($P < 0.01$)。在肝和卵巢中 AMH 基因 mRNA 表达水平低,而在其他组织中则未检测到其表达(图 3)。

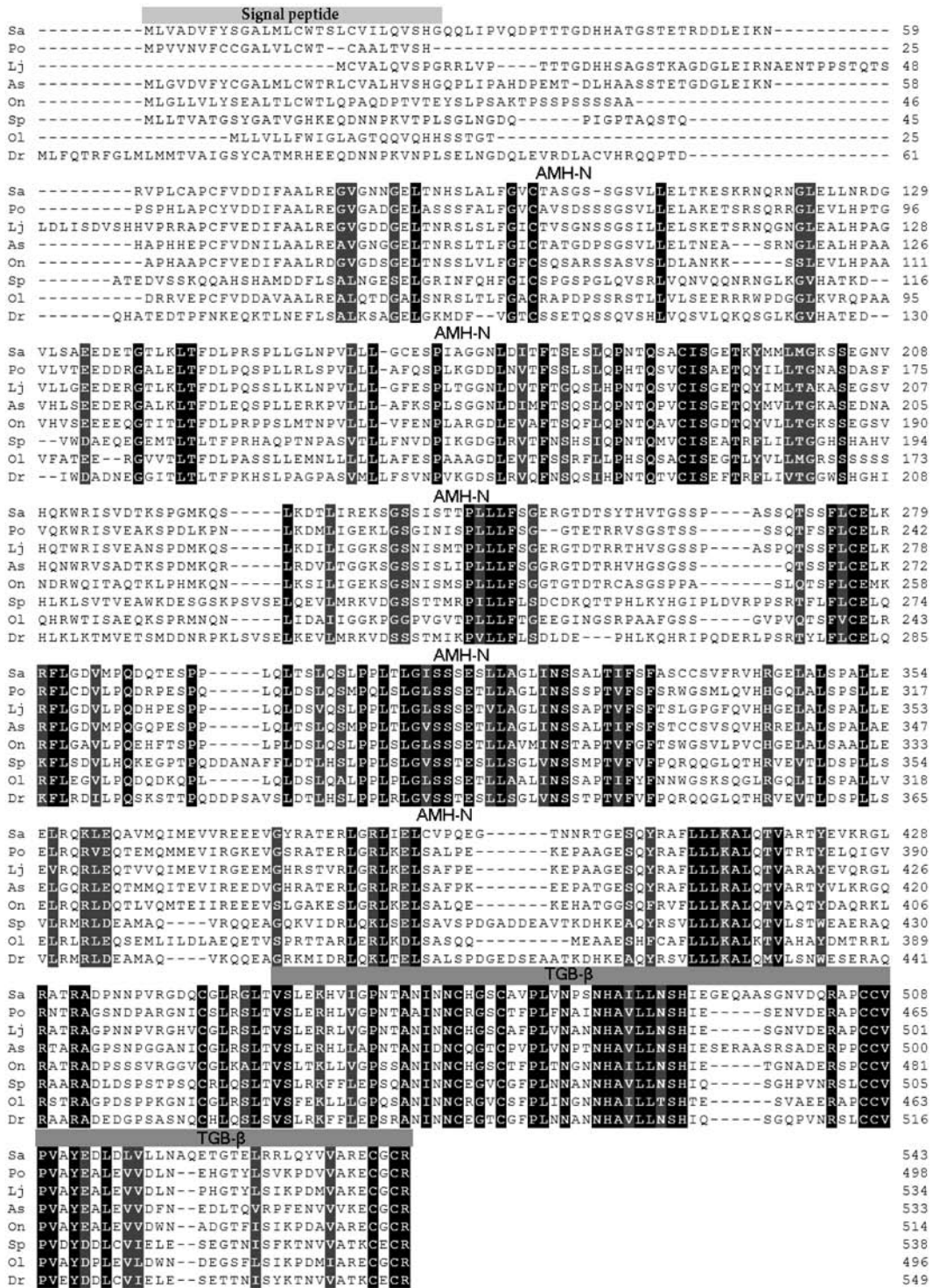


图1 金钱鱼 AMH 氨基酸序列的预测及与其他鱼类 AMH 氨基酸序列的比较

GenBank 登录号:KP718479(金钱鱼. Sa),BAD37138. 1(牙鲆. Po),AEZ68609. 1(花鲈. Lj),ADB22521. 1(黑鲷. As),ABS58513. 1(尼罗罗非鱼. On),ABX55992. 1(核雅罗鱼. Sp),BAF34132. 1(日本青鳉. Ol),AAx81416. 1(斑马鱼. Dr)

Fig. 1 Predicted AMH amino acid sequence of *S. argus* and alignment with other teleost

GenBank accession number:KP718479(*S. argus*. Sa),BAD37138. 1(*P. olivaceus*. Po),AEZ68609. 1(*L. japonicus*. Lj),ADB22521. 1(*A. schlegelii*. As),ABS58513. 1(*Oreochromis niloticus*. On),ABX55992. 1(*S. pyrenaeicus*. Sp)BAF34132. 1(*Oryzias latipes*. Ol),AAx81416. 1(*D. rerio*. Dr)

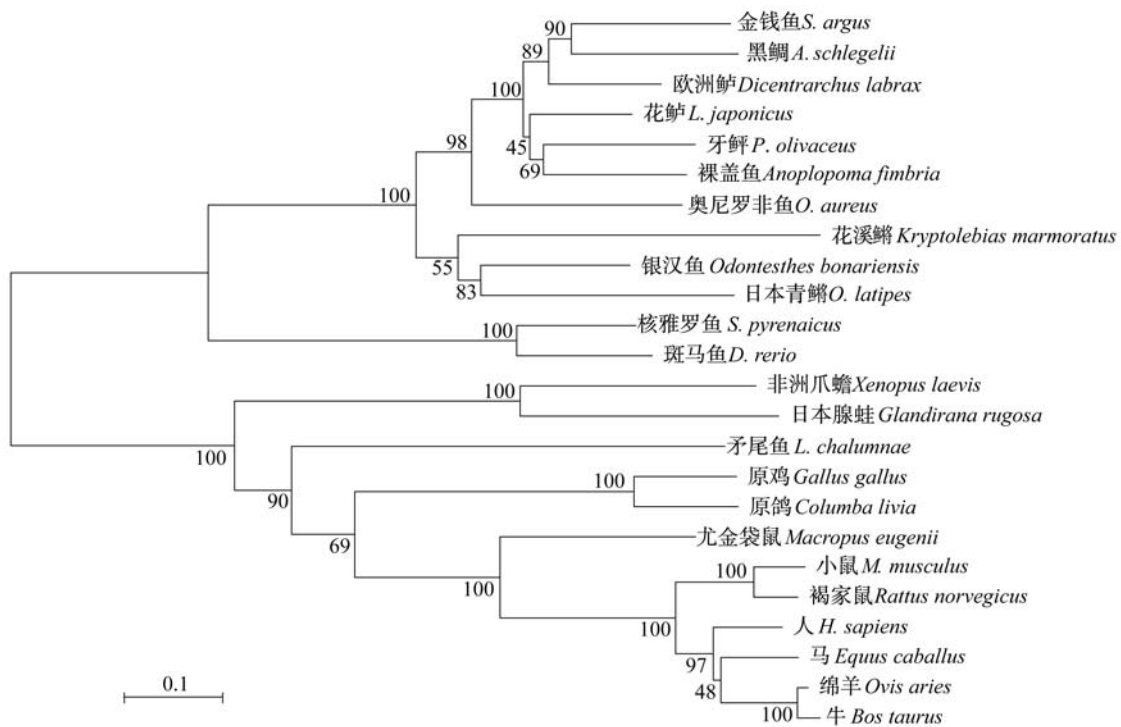


图2 NJ法构建金钱鱼AMH与其他脊椎动物AMH系统树

GenBank 登录号: 牙鲆 (BAD37138.1), 花鲈 (AEZ68609.1), 欧洲鲈 (CAJ78431.1), 黑鲷 (ADB22521.1), 奥里亚罗非鱼 (ABW98500.1), 裸盖鱼 (AGH69792.1), 银汉鱼 (AHG98063.1), 日本青鲮 (BAF34132.1), 花溪鲮 (ACL00867.1), 小鼠 (CAC10450.1), 褐家鼠 (EDL89230.1), 原鸡 (CAA61536.1), 原鸽 (EMC88906.1), 人 (EAW69397.1), 绵羊 (AGT42011.1), 牛 (AAA98765.1), 尤金袋鼠 (AAR06911.1), 马 (AEA11205.1), 非洲爪蟾 (BAO04196.1), 矛尾鱼 (XP_005993872.1), 斑马鱼 (AAX81416.1), 核雅罗鱼 (ABX55992.1)

Fig. 2 Phylogenetic tree of *S. argus* AMH and other species AMH based on the Neighbor-joining method

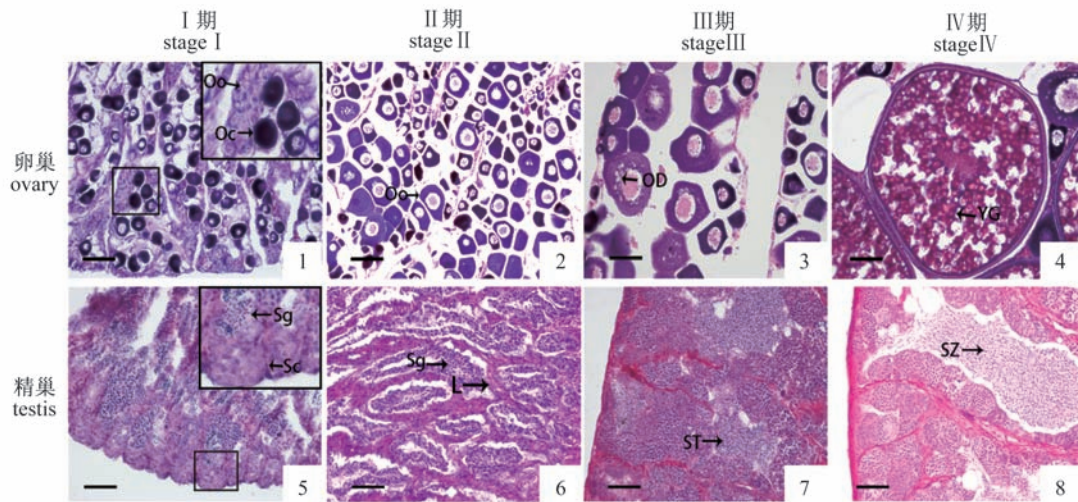
GenBank accession number: *P. olivaceus* (BAD37138.1), *L. japonicus* (AEZ68609.1), *D. labrax* (CAJ78431.1), *A. schlegelii* (ADB22521.1), *O. aureus* (ABW98500.1), *A. fimbria* (AGH69792.1), *O. bonariensis* (AHG98063.1), *O. latipes* (BAF34132.1), *K. marmoratus* (ACL00867.1), *M. musculus* (CAC10450.1), *R. norvegicus* (EDL89230.1), *G. gallus* (CAA61536.1), *C. livia* (EMC88906.1), *H. sapiens* (EAW69397.1), *O. aries* (AGT42011.1), *B. Taurus* (AAA98765.1), *M. eugenii* (AAR06911.1), *E. caballus* (AEA11205.1), *X. laevis* (BAO04196.1), *L. chalumnae* (XP_005993872.1), *D. rerio* (AAX81416.1), *S. pyrenaicus* (ABX55992.1)

2.4 金钱鱼不同发育时期性腺中AMH基因mRNA的表达水平

根据H.E染色结果可将卵巢分为I、II、III和IV期(图版-1~4),精巢分为I、II、III和IV期(图版-5~8)。Real-time PCR定量分析显示精巢在各个时期表达量均显著高于卵巢($P < 0.05$)。在卵巢I期(图版-1)和II期(图版-2),AMH基因mRNA的相对水平较低,在III期(图版-3)、IV期(图版-4)表达量增加。但是其水平在每个时期之间无显著差异($P > 0.05$)。在精巢I、II和III期(图版-5,6和7)AMH基因mRNA的相对水平较高,在这3期之间无显著差异,但是在第IV期(图版-8)时表达水平显著降低(图4)。

3 讨论

本研究克隆到金钱鱼AMH基因cDNA全长2324bp,编码543个氨基酸。生物信息学分析显示其结构包含信号肽,AMH-N域和TGF- β 结构域,编码区包含9个保守的半胱氨酸残基。其中AMH-N结构域存在糖基化位点,TGF- β 结构域含有特异性裂解位点,对AMH蛋白二聚体的形成必不可少。与其他鱼类氨基酸序列同源性比较,金钱鱼AMH与花鲈同源性最高,为71.35%,与斑马鱼仅为29.83%。系统进化树分析显示金钱鱼AMH与鲈形目紧密聚为一支,与金钱鱼物种地位一致,说明AMH基因在物种进化过程中呈现一定的保守性。



图版 金钱鱼精巢、卵巢不同发育时期形态结构

1,2,3,4 分别为卵巢 I、II、III、IV 时期的形态结构。5,6,7,8 分别为精巢 I、II、III、IV 时期的形态结构。Oo 卵原细胞, Oc 卵母细胞, OD 油滴, YG 卵黄颗粒, Sg 精原细胞, Sc 精母细胞, L 支持细胞, ST 精子细胞, SZ 精子。标尺 50 μm

Plate Morphological structure of testis and ovary of *S. argus* at different development stages

1,2,3,4 are the morphological structure of ovary at the development stages of I, II, III, IV, respectively. 5,6,7,8 are the morphological structure of testis at the development stages of I, II, III, IV, respectively. Oo oogonia, Oc oocyte, OD oil droplet, YG yolk granules, Sg spermatogonia, Sc spermatocyte, L leydig, ST spermatid, SZ spermatozoa. Scale bar = 50 μm

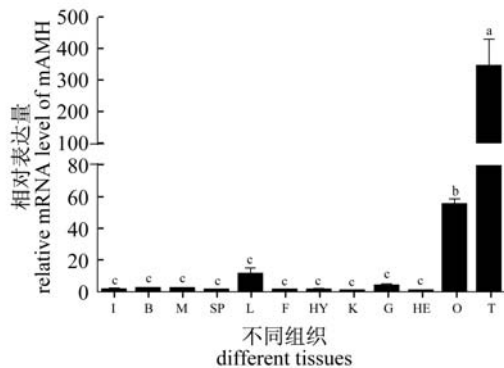


图3 金钱鱼各组织中 AMH 基因 mRNA 的表达水平 I:肠;B:脑;M:肌肉;SP:脾;L:肝;F:鳍条;HY:垂体;K:肾;G:鳃;HE:心脏;O:卵巢;T:精巢。不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$),下同

Fig. 3 mRNA level of AMH gene in different tissues of *S. argus*

I: intestine; B: brain; M: muscle; SP: spleen; L: liver; F: fin; HY: hypophysis; K: kidney; G: gill; HE: heart; O: ovary; T: testis. Bars with different letters are significantly different ($P < 0.05$), the same as below

对多种鱼类研究发现,AMH 基因在不同组织中的表达模式有一定差别^[20]。在斑马鱼中,AMH 在性腺和肝、肾、心脏、肌肉、眼和皮肤中均有表

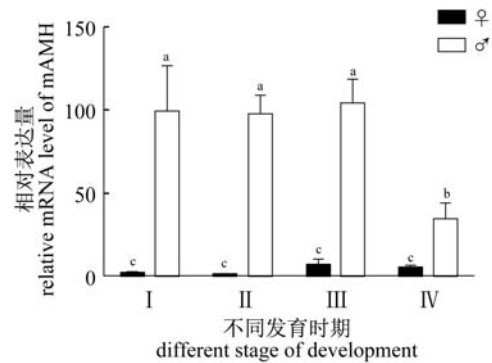


图4 金钱鱼精巢、卵巢不同发育时期 AMH 基因 mRNA 的相对表达水平

I、II、III、IV 分别为不同发育时期

Fig. 4 Relative mRNA level of AMH gene of testis and ovary of *S. argus* at different development stages

I, II, III, IV: different stage of development

达^[14]。半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) 中, AMH 在性腺及血液、皮肤和脑中表达,并且精巢中表达量水平很高^[21]。本研究通过荧光定量分析发现,金钱鱼成鱼中 AMH 主要表达于性腺,在肝中也有低水平表达,而在其他组织中几乎不表达,并且精巢中表达量显著高于卵巢。说明其主

要在性腺中发挥作用。但 *AMH* 在硬骨鱼非性腺组织中的作用目前还没有研究。

性腺不同发育时期分析表明,金钱鱼性腺发育早期 I、II 期,*AMH* 基因在卵巢中基本不表达,但在精巢中表达量极高。这与斑马鱼表达结果相似,斑马鱼幼体时期,在雄性中能检测到 *AMH* 表达,在雌性中检测不到^[14]。在成鱼中,精巢和卵巢中均能检测到 *AMH* 表达。哺乳动物中 *AMH* 基因的表达受睾丸分化前期的支持细胞中 *SOX9* 的调控,并受 SF-1、GTTA、WT1、DAX1 和 FSH 因子的调节^[5]。*SOX9* 在硬骨鱼雄性性腺分化和发育中也具有重要作用^[22],硬骨鱼中 *AMH* 的表达可能也受 *SOX9* 影响,对精巢早期发育进行调控。金钱鱼 *AMH* 基因在未成熟精巢中持续高表达,但在精巢成熟精子发生时下降,与大西洋鲑 (*Salmo salar*)^[23] 和半滑舌鳎^[21] 结果相似。通过小鼠实验证明,减数分裂期的精母细胞和雄性激素协同作用可以抑制 *AMH* 基因的表达^[24-25]。金钱鱼卵巢中 III、IV 期时 *AMH* 表达升高,H.E 切片显示 III、IV 期为卵母细胞大生长期和卵黄充满期,该时期滤泡膜细胞分裂增殖,卵黄逐渐积累^[18]。*AMH* 可能在金钱鱼卵泡发育过程中发挥作用。通过对啮齿动物的研究发现,*AMH* 在卵泡发育过程中主要通过抑制其在初级卵母细胞生长初始时抑制其发育,或通过降低卵泡中 FSH 的响应能力来影响窦前卵泡和小窦卵泡的生长^[26-27]。目前硬骨鱼中 *AMH* 功能研究较少,本研究初步对 *AMH* 在金钱鱼精巢、卵巢发育过程中的作用进行探讨,但具体机制还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Cate R L, Mattaliano R J, Hession C, *et al.* Isolation of the bovine and human genes for Mullerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells [J]. *Cell*, 1986, 45 (5) : 685 - 698.
- [2] Visser J A, Themmen A P. Anti-Mullerian hormone and folliculogenesis [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2005, 234 (1 - 2) : 81 - 86.
- [3] Lee M M, Donahoe P K. Mullerian inhibiting substance: a gonadal hormone with multiple functions [J]. *Endocrine Reviews*, 1993, 14 (2) : 152 - 164.
- [4] Munsterberg A, Lovell B R. Expression of the mouse anti - mullerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation [J]. *Development*, 1991, 113 (2) : 613 - 624.
- [5] Watanabe K, Clarke T R, Lane A H, *et al.* Endogenous expression of Mullerian inhibiting substance in early postnatal rat sertoli cells requires multiple steroidogenic factor-1 and GATA-4-binding sites [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97 (4) : 1624 - 1629.
- [6] Johnsen H, Tveiten H, Torgersen J S, *et al.* Divergent and sex-dimorphic expression of the paralogs of the Sox9-Amh-Cyp19a1 regulatory cascade in developing and adult atlantic cod (*Gadus morhua* L.) [J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2013, 80 (5) : 358 - 370.
- [7] Beau C, Vivian N, Munsterberg A, *et al.* *In vivo* analysis of the regulation of the anti - Mullerian hormone, as a marker of Sertoli cell differentiation during testicular development, reveals a multi - step process [J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2001, 59 (3) : 256 - 264.
- [8] Behringer R R, Cate R L, Froelick G J, *et al.* Abnormal sexual development in transgenic mice chronically expressing mullerian inhibiting substance [J]. *Nature*, 1990, 345 (6271) : 167 - 170.
- [9] Grondahl M L, Nielsen M E, Dal Canto M B, *et al.* Anti-Mullerian hormone remains highly expressed in human cumulus cells during the final stages of folliculogenesis [J]. *Reproductive Biomedicine Online*, 2011, 22 (4) : 389 - 398.
- [10] Visser J A, Schipper I, Laven J S, *et al.* Anti - Mullerian hormone: an ovarian reserve marker in primary ovarian insufficiency [J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2012, 8 (6) : 331 - 341.
- [11] Ebner T, Shebl O, Holzer S, *et al.* Viability of cumulus cells is associated with basal AMH levels in assisted reproduction [J]. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 2014, 183 : 59 - 63.
- [12] Imbeaud S, Faure E, Lamarre I, *et al.* Insensitivity to anti - mullerian hormone due to a mutation in the human anti - mullerian hormone receptor [J]. *Nature Genetics*, 1995, 11 (4) : 382 - 388.
- [13] Miura T, Miura C, Konda Y, *et al.* Spermatogenesis - preventing substance in Japanese eel [J]. *Development*, 2002, 129 (11) : 2689 - 2697.
- [14] von Hofsten J, Larsson A, Olsson P E. Novel steroidogenic factor - 1 homolog (ffd) is coexpressed with anti-Mullerian hormone (AMH) in

- zebrafish [J]. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 2005, 233(2): 595 - 604.
- [15] Chen J H, He M X, Mu X J, *et al.* cDNA Cloning and mRNA Expression Analysis of Sox9 in *Scatophagus argus* [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2015, 50(1): 93 - 102. [陈建华, 何毛贤, 牟幸江, 等. 金钱鱼 Sox9 cDNA 克隆及其表达分析. 动物学杂志, 2015, 50(1): 93 - 102.]
- [16] Cui D, Liu Z W, Liu N X, *et al.* Histological study on the gonadal development of *Scatophagus argus* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(5): 696 - 704. [崔丹, 刘志伟, 刘南希, 等. 金钱鱼性腺发育及其组织结构观察. 水产学报, 2013, 37(5): 696 - 704.]
- [17] Liu H, Mu X, Gui L, *et al.* Characterization and gonadal expression of FOXL2 relative to Cyp19a genes in spotted scat *Scatophagus argus* [J]. *Gene*, 2015, 561(1): 6 - 14.
- [18] Zhu Y L. The observation of the stage of oocyte staging and the histological observation of the ovarian staging of *Oreochromis niloticus*. [J] *Journal of Fujian Fisheries*, 1987, (1): 21 - 26. [朱云林. 尼罗罗非鱼卵母细胞的分期及成长鱼卵巢分期组织学的观察. 福建水产, 1987, (1): 21 - 26.]
- [19] Schmittgen T D, Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method [J]. *Nature Protocols*, 2008, 3(6): 1101 - 1108.
- [20] Wu G C, Li H W, Luo J W, *et al.* The potential role of amh to prevent ectopic female development in testicular tissue of the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegelii* [J]. *Biology of Reproduction*, 2015, 114, 126953.
- [21] Liu S S, Sun B, Liang Z, *et al.* Cloning and expression of anti-Mullerian hormone gene in half-smooth tongue - sole, *Cynoglossus semilaevis* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(1): 35 - 43. [刘姗姗, 孙冰, 梁卓, 等. 半滑舌鳎抗缪勒氏管激素 (AMH) 基因的克隆及组织表达分析. 中国水产科学, 2013, 20(1): 35 - 43.]
- [22] Rodriguez M A, Yan Y L, Bremiller R A, *et al.* Characterization and expression pattern of zebrafish Anti-Mullerian hormone (Amh) relative to sox9a, Sox9b, and Cyp19a1a, during gonad development [J]. *Gene Expression Patterns*, 2005, 5(5): 655 - 667.
- [23] Maugars G, Schmitz M. Gene expression profiling during spermatogenesis in early maturing male Atlantic salmon parr testes [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2008, 159(2 - 3): 178 - 187.
- [24] Al-Attar L, Noel K, Dutertre M, *et al.* Hormonal and cellular regulation of sertoli cell anti - Mullerian hormone production in the postnatal mouse [J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 1997, 100(6): 1335 - 1343.
- [25] Chen Y P, Wu W H, Wu H M, *et al.* Effects of anti-Mullerian hormone and follicle stimulating hormone levels on in vitro fertilization pregnancy rate [J]. *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology*, 2014, 53(3): 313 - 316.
- [26] Daneshian Z, Ramezani T F, Zarkesh M, *et al.* Antimullerian hormone and its receptor gene expression in prenatally androgenized female rats [J]. *International Journal of Endocrinology and Metabolism*, 2015, 13(1): e19511.
- [27] Hammoud I, Vialard F, Bergere M, *et al.* Follicular fluid protein content (FSH, LH, PG4, E2 and AMH) and polar body aneuploidy [J]. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2012, 29(10): 1123 - 1134.

Gene cloning of anti – Müllerian hormone and analysis of its mRNA level in *Scatophagus argus* at the different development stages of gonad

ZENG Wengang, LIU Zhenhao, LI Hong, ZHANG Junbin*

(College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: To study the role of *AMH* in gonadal development of *Scatophagus argus*, we cloned the full – length cDNA sequence of anti-Müllerian hormone (*AMH*) from *S. argus* using the RACE technique, which is 2 324 bp in length (GenBank no. : KP718479). The open reading frame (ORF) of this gene spanned a region of 1 631 bp and encoded 543 amino acids. *AMH* of *S. argus* shared 71.16% similarity in sequence with that of *Lateolabrax japonicus*, while only 29.83% similarity with that of *Danio rerio*. S. alignment analysis revealed that *S. argus* *AMH* is closely related to Perciformes *AMH*, indicating *AMH* is conserved during evolution. The protein peptide contains a signal peptide (1 – 28 amino acids), an *AMH* – N domain (69 – 426 amino acids), and a TGF- β conserved domain (444 – 543 amino acids). Results of Real-time PCR showed that the mRNA level of *AMH* in testis of adult *S. argus* is significantly higher than that in other organs. *AMH* expression was also detected in liver and ovary. In addition, the mRNA expression of testis *AMH* at the development stages of I, II and III was kept at a high level, but was significantly decreased at the development stage of IV. According to the results of H. E staining, spermatogenesis happened in these stages, indicating an important role of *AMH* in testis development and the sperm production. In the ovary, *AMH* expression level in I, II oocyte development stages is low, while in the III, IV stages, when the oocytes are rapidly growing and yolk are gradually accumulating, the *AMH* level is high. The results demonstrated that *AMH* is involved in the development and function maintaining of oocyte. Taken together, *AMH* played a significant role in the development and function of both testis and ovary.

Key words: *Scatophagus argus*; *AMH*; sequence analysis; gene expression

Corresponding author: ZHANG Junbin. E-mail: jb-zhang@shou.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China(41176109)